

特開 2003-253262

(P 2003-253262A)

(43) 公開日 平成15年9月10日 (2003. 9. 10)

(51) Int. Cl. 7		識別記号		F I		テーマコード (参考)	
C 0 9 K	15/34			C 0 9 K	15/34		2B150
A 2 3 C	9/123			A 2 3 C	9/123		4B001
A 2 3 K	1/16	3 0 4		A 2 3 K	1/16	3 0 4 B	4B017
A 2 3 L	1/30			A 2 3 L	1/30	B	4B018
	2/52			A 6 1 K	35/20		4C087
審査請求	未請求	請求項の数 5	O L			(全 1 1 頁)	最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2002-54730 (P2002-54730)

(22) 出願日 平成14年2月28日 (2002. 2. 28)

(71) 出願人 000006699

雪印乳業株式会社

北海道札幌市東区苗穂町6丁目1番1号

(72) 発明者 藤原 茂

埼玉県所鶴ヶ島市脚折1385-34

(72) 発明者 瀬戸 泰幸

埼玉県川越市野田町1-13-22 相原マン  
ション306

(72) 発明者 今泉 勝己

福岡県福岡市西区富重4丁目16-16

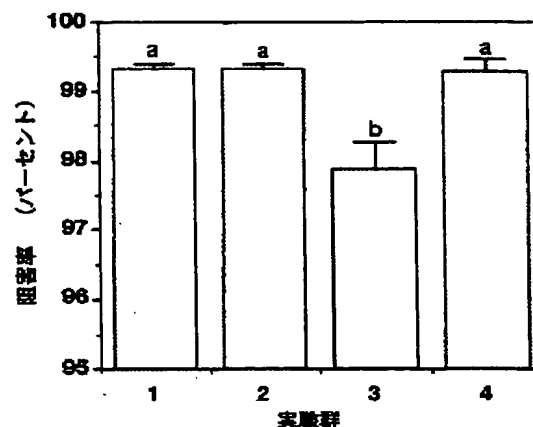
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗酸化剤

(57) 【要約】

【課題】 食品、飼料、化粧品またはこれらの原料等の酸化による品質低下を防ぐのに有効な抗酸化活性を有し、食品、飼料、化粧品に添加することにより、それを有効に利用するヒトまたは動物の生体内酸化により発生する活性酸素やフリーラジカルを消去もしくは低減、またはそれらによる活性酸素やフリーラジカルを消去もしくは低減、またはそれらによる過酸化脂質の発生を低減するのに有効な抗酸化活性を有する、天然物由来の抗酸化剤の提供。

【解決手段】 ラクトバチルス・ガセリ (*Lactobacillus gasseri*) に属する乳酸菌を培養して得られる菌体及びその培養物を有効成分とする培養物及び／または菌体を有効成分とする抗酸化剤、さらにこのような有効成分を含有してなる抗酸化作用のある飲食品を調製する。



実験群 1. 脱脂乳 (10%) + サフラワー油 給餌  
 2. 脱脂乳 (10%) + 活性炭処理サフラワー油 給餌  
 3. 脱脂乳 培養物 (10%) + サフラワー油 給餌  
 4. 脱脂乳 培養物 (10%) + 活性炭処理サフラワー油 給餌

ab異なる上書き文字は危険率5%での有意差を示す

## 【特許請求の範囲】

【請求項 1】ラクトバチルス・ガセリ (*Lactobacillus gasseri*) に属する乳酸菌を培養して得られる培養物及び／または菌体を有効成分とする抗酸化剤。

【請求項 2】ラクトバチルス・ガセリ (*Lactobacillus gasseri*) に属する乳酸菌が、ヒト腸管内定着性を有するラクトバチルス・ガセリ (*Lactobacillus gasseri*) である請求項 1 記載の抗酸化剤。

【請求項 3】ラクトバチルス・ガセリ (*Lactobacillus gasseri*) に属する乳酸菌を培養して得られる培養物が醗酵乳である、請求項 1 又は 2 記載の抗酸化剤。

【請求項 4】ラクトバチルス・ガセリ (*Lactobacillus gasseri*) に属する乳酸菌がラクトバチルス・ガセリ (*Lactobacillus gasseri*) ・SBT2055 (以下 LG2055 という) (FERM P-15535) である請求項 1 ～ 3 のいずれかに記載の抗酸化剤。

【請求項 5】ラクトバチルス・ガセリ (*Lactobacillus gasseri*) に属する乳酸菌を培養して得られる培養物及び／または菌体を添加した抗酸化作用を有する飲食品又は飼料。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】食品、飼料、化粧品またはこれらの原料等の酸化による品質低下を防ぐのに有効な抗酸化活性を有し、食品、飼料、化粧品に添加することにより、それを利用するヒトまたは動物の生体内酸化により発生する活性酸素やフリーラジカルを消去もしくは低減、またはそれらによる過酸化脂質の発生を低減するのに有効な抗酸化活性を有する、天然物由来の抗酸化剤に関する。本発明はまた、天然物由来の抗酸化剤を含有する、食品または飼料に関する。本発明はまた、食品、飼料、化粧品に添加することにより、それを利用するヒトまたは動物の生体内で発生する活性酸素やフリーラジカルを消去もしくは低減、またはそれらによる過酸化脂質の発生を低減するための治療剤に関する。

## 【0002】

【従来の技術】近年、食生活の欧風化に伴い、高脂肪食品を摂取する機会が増え、高脂血症、動脈硬化症等の成人病が増加している。この現象は、中高年層のみならず、若年層にまで及んでいる。その結果、生体内脂質の酸化によってさまざまな疾病が招来されることとなった。抗酸化剤には、食品、飼料及び化粧品に添加し、その品質を保持する目的で使用されるものと、その抗酸化剤を生体に投与することにより、生体内酸化により発生する活性酸素、フリーラジカル及び過酸化脂質を消去または低減し、つまり生体内酸化を防止または低減する目的で使用されるものがある。

【0003】食品、飼料または化粧品に含まれる油脂類、色素、その他の有効成分が保存中に酸化されると、製品の樹脂化、異臭発生、着色、変色、毒性物質の生成

または栄養価の低下を引き起こす。このため、食品、飼料及び化粧品には品質保持のための抗酸化剤が含有されていることが多い。このような抗酸化効果は、油脂の酸化抑制効果および色素退色抑制効果を試験することにより測定される。

【0004】このような目的で、従来主として食品、化粧品あるいは医薬品などの分野で用いられている抗酸化剤としては、例えば、トコフェロール (ビタミン E)、アスコルビン酸 (ビタミン C) 等の天然抗酸化剤や、ブチルヒドロキシアニソール (BHA)、ジブチルヒドロキシトルエン (BHT) などのフェノール系合成抗酸化剤が知られている。トコフェロールは油脂の抗酸化剤としてよく用いられるが、水に溶けにくいいため用途が限られ、また肝心の抗酸化力があり高くないためほかの抗酸化剤と併用するなどの必要があった。アスコルビン酸は、水溶性の抗酸化剤として用いられ油脂へは使用しにくく、また食品に用いる場合にその酸味が付与されることから食品の味を変えてしまい、また合成抗酸化剤と比較してその抗酸化力が劣るという欠点があった。一方、BHA や BHT のような合成抗酸化剤は、その抗酸化力は強いが、その発ガン性や肺・肝臓への悪影響が指摘されていること等、安全性が疑問視されるようになった。このようなことから、抗酸化力の強い、汎用性の高い、天然の抗酸化剤の開発が望まれてきた。

【0005】従来、天然の抗酸化剤として以下のようなものが報告されている。ミカン科植物果皮の水または含水アルコール抽出物を有効成分として含有する抗酸化性組成物 (特開平 8-259945 号公報)、ミカン科コブミカンの葉の抽出物を有効成分とする抗酸化剤組成物 (特開平 11-199427 号公報)、緑色植物の緑葉から抽出した抗酸化活性画分を配合した飲食品類 (特開平 11-123071 号公報)、成熟前期の麦類の緑葉に水に可溶性または n-ヘキサンに不溶性で且つ含水率が 80% 以下の含水エタノールに可溶性の画分であって、2-O-グルコシルーイソビテキシンを含有することを特徴とする麦類の緑葉の抗酸化活性画分 (特開平 5-65480 号公報)、ヤマモモ科ヤマモモ属植物から炭素数 1 から 5 までの脂肪族アルコール系有機溶媒および／またはその他の有機溶媒の 1 種以上を用いて抽出した抗酸化剤 (特開平 5-156249 号公報)、冬葵子の溶媒抽出物を含む食品および化粧品 (特開平 9-59127 号公報)、クフェア属植物に含有される抗酸化性物質を極性溶媒で抽出、採取することとを特徴とする抗酸化性物質の製造法 (特開平 6-212154 号公報)、オリーブ植物溶媒抽出物の加水分解物を有効成分としてなる抗酸化剤 (特開平 9-78061 号公報) 等が報告されている。また、乳酸菌の抽出物にも抗酸化効果が見出されており、本出願人は特開平 4-264034 号、特開平 5-276912 号公報に技術を開示している。この技術は、乳酸菌の中のラクトバチルス・デルブルッキー及びラクトバチルス・ブルガリクスに属する乳酸菌に由来す

るものである。この乳酸菌はヒト腸管に定着性を有しない。

【0006】従来一般に、抗酸化剤とは食品、飼料、化粧品などの酸化を防止する保存料であると考えられていた。しかし、近年になって、これまで食品に用いられてきた抗酸化剤に、生体内酸化により発生するフリーラジカル、活性酸素及び過酸化脂質を消去または低減する抗酸化効果を有するものがあることが明らかになり、また生体内抗酸化力が強い天然抽出物の探索 (Food & Food Ingredients Journal of Japan, 163, 19-29 (1995)、New Food Industry, 39(3), 17-24 (1997)、月刊フードケミカル1998-8, P. 33-41) が行われるようになった。

【0007】生体内酸化により生成するフリーラジカルや活性酸素には様々なものが知られている。フリーラジカルは不対電子を持つ分子種の総称であるため、様々な生体内フリーラジカルが存在するが、活性酸素でもあるフリーラジカルとしてスーパーオキシドアニオン、ヒドロキシルラジカルが知られている。また、フリーラジカルではない活性酸素には、過酸化水素および一重項酸素が知られている。これらの中で一般に生体内抗酸化効果の指標として測定されるものは、1,1-ジフェニル-2-ピクリルヒドラジル (DPPH) を用いたラジカル消去活性、スーパーオキシドアニオン消去活性、ヒドロキシルラジカルの消去活性および過酸化脂質生成抑制活性であり、一般にこれらの活性を有するものを生体内抗酸化力のある抗酸化剤と位置づけている (月刊フードケミカル1998-8, P. 33-41)。

【0008】最近では、臨床レベルで食品による老化防止の可能性を評価する際に、遺伝子レベルにおける酸化的障害を測定する方法が研究されている。なかでも、生体内脂質過酸化反応の結果生じた活性酸素によるDNA中の核酸塩基 (デオキシグアノシン) に対する攻撃の結果、8-ヒドロキシデオキシグアノシン (8-OHdG) が生成し、このDNA中に生じた8-OHdGは、通常はDNA修復酵素により切り取られ、血中を経て最終的には尿中に排出されることが明らかになった。従って、血液や尿中の8-OHdG量を測定することにより老化防止効果を測定することができるが、この測定には免疫化学的な手法であるELISA法を用い、この方法はまだコストが高く、一般的な方法として確立されているわけではない。従って、現状では、生体内抗酸化効果の指標として、通常は前述のフリーラジカル消去活性および活性酸素消去活性等の測定を行っている。

【0009】現在、生体内酸化により引き起こされると考えられている疾患として、以下のものが知られている。脳・神経系疾患としては、脳浮腫、外傷性てんかん、脳虚血、パーキンソン病、脊髄損傷等が、目の疾患としては、白内障、網膜変性、未熟児網膜症等が、呼吸器系疾患としては、気管支喘息、肺気腫、肺繊維症、成

人呼吸窮迫症候群 (ARDS)、未熟児呼吸窮迫症候群 (IRDS) 等が、循環器系疾患としては、動脈硬化、心筋梗塞等が、消化器系疾患としては、潰瘍性大腸炎、ストレス性胃潰瘍、すい炎、消化管粘膜障害等が、皮膚疾患としては、紫外線障害、アトピー性皮膚炎、火傷、凍傷、床ずれ等が、腎臓疾患としては、腎炎、腎不全等が、その他の疾患としては、ガン、糖尿病、膠原病、リウマチ、アルツハイマー病、自己免疫疾患、ベーチェット病等が挙げられる。また、老化、老化による皮膚のしわや痴呆症も、生体内酸化によると考えられている。生体内酸化を防止又は低減する抗酸化剤は、このような疾患の予防・治療につながると考えられ、機能性食品あるいは健康食品として注目されるようになった。

【0010】このような用途の抗酸化剤としては、ハンタイカイを水または含水有機溶媒で抽出して得られる抽出物を有効成分として含有する活性酸素消去剤 (特開平8-20544号公報)、植物種子又は胚芽類を培煎した後、酵素処理したものに植物種子を加えて得られる組成物を非極性溶媒で洗浄し、その後不溶物を極性溶媒で抽出してなることを特徴とする抗活性酸素作用組成物 (特開平4-139132号公報)、オウギより抽出したアスチルビン含有することを特徴とする活性酸素消去剤 (特開平6-65074号公報)、キハダ果実を水、メタノール等の溶媒で抽出してなる抗酸化作用を有するエキス (特開平10-17485号公報)、新規ミント交配種のエッセンスからなる、活性酸素消去剤 (特開平10-66465号公報)、植物繊維成分を含有する培地を用いて担子菌及び／又は子囊菌の菌糸体を培養し、この培養物から抽出して得られた糖質、蛋白質、水溶性リグニンを主成分とすることを特徴とする生体の抗酸化機能増強剤 (特開平11-228441号公報)、アカミノキ、ウヤク、ウワウルシ、ジコッピ、シソ、テンチャ、ハス、ラベンダーから選ばれる1種以上の植物抽出物を含有することを特徴とする活性酸素消去剤 (特開平11-279069号公報)、カプサンチン又はその脂肪酸エステルを有効成分とする抗酸化剤 (特開平10-195433号公報)、ごまの植物体から誘導された増殖性細胞の培養物の溶媒抽出由来のスーパーオキシドディスムターゼ様活性物質 (特開平4-275226号公報) 等が報告されている。また、ルイボスティー抽出物、イチヨウ葉乾燥エキス等が上市されている。

【0011】また、品質保持用の抗酸化効果と生体内抗酸化効果の両方を持つ抗酸化剤としては、香辛料植物の一種であるフェンネルの葉と茎から極性溶媒で抽出して得られた物質を有効成分とする抗酸化剤 (特開平6-299151号公報)、ユキノシタ科のユキノシタ植物抽出物を有効成分とすることを特徴とする抗酸化剤 (特開平10-46142号公報) 等が開示されている。また、茶抽出物、ブドウ種子抽出物等が生体内酸化を抑制することが知られている。しかし、ヒト腸管内定着性を示す乳酸菌が生体内酸化を抑制することは知られていない。

## 【0012】

【発明が解決しようとする課題】従来報告されてきた品質保持用の抗酸化剤には、合成品と天然抽出物がある。合成品は安全性に問題があることから、天然で安全性の高い抗酸化剤が求められているが、天然の抗酸化剤にも様々な問題点があり、改善が求められている。

【0013】例えば、トコフェロール、ゴマの抽出物、ヒマワリ種子抽出物のように基本的に脂溶性である抗酸化剤は、水溶系の製品に用いる場合にそのままでは使用しにくく、水溶性の抗酸化剤は油脂類には使用しにくいという欠点があった。また、特有の味や風味を有する抗酸化剤は、製品の味や風味に影響を与えるため使用範囲が限られていた。従って、広範囲の食品、飼料及び化粧品に付与される味や臭いが許容される範囲内であり、わずかな投与量で酸化防止効果を示す天然の抗酸化剤が望まれている。

【0014】また、これまで知られている生体内抗酸化剤に関しても、様々な問題が存在する。従来、漢方やハーブまたは民間薬として知られているような植物の抽出物は、抗酸化効果以外の薬効を有し、その薬効による副作用が発現することがあった。このようなことから、従来より食品として扱われてきた、安全な植物由来の天然抗酸化剤が望まれている。また、従来の天然抗酸化剤は、抗酸化剤の抽出目的で栽培され、使用されるため、コストが高いという問題もあった。

## 【0015】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、以上の問題点に鑑み、ヒトあるいは動物に安全な、低コストで製造できる、用途の広い抗酸化剤について鋭意検討を重ねてきた。本発明者らは、種々の発酵乳の研究を行っていたところ、これらの発酵乳から分離された乳酸菌やヒト由来の乳酸菌の中で特にラクトバチルス・ガセリに從來に見られない高いヒト腸管内定着性を有しており、さらにこのラクトバチルス・ガセリ乳酸菌及び、その変異株の培養物および菌体が生体内抗酸化効果をもたらすことを見出し、上記課題の解決に成功した。

【0016】本明細書において、「抗酸化効果」とは、食品、飼料をヒトあるいは動物に投与した際に、生体内で発生するフリーラジカルや活性酸素を消去または低減して細胞膜の安定化効果を発揮する、生体内酸化防止効果を包含する。「抗酸化剤」とはこのような抗酸化効果を有する剤である。すなわち、本発明は、ラクトバチルス・ガセリ (*Lactobacillus gasserii*) に属する乳酸菌を培養して得られる菌体、その培養物を有効成分とする抗酸化剤に関する。さらに、本発明は、このような有効成分を含有してなる抗酸化作用を有する飲食品に関する。即ち本発明は特許請求範囲に記載した下記の構成からなる発明である。

【0017】(1) ラクトバチルス・ガセリ (*Lactobacillus gasserii*) に属する乳酸菌を培養して得られる培養

物及び／または菌体を有効成分とする抗酸化剤。

(2) ラクトバチルス・ガセリ (*Lactobacillus gasserii*) に属する乳酸菌が、ヒト腸管内定着性を有するラクトバチルス・ガセリ (*Lactobacillus gasserii*) である

(1) 記載の抗酸化剤。

(3) ラクトバチルス・ガセリ (*Lactobacillus gasserii*) に属する乳酸菌を培養して得られる培養物が醗酵乳である、(1) 又は (2) のいずれかに記載の抗酸化剤。

(4) ラクトバチルス・ガセリ (*Lactobacillus gasserii*) に属する乳酸菌が LG2055 (FERM P-15535) である

(1) ~ (3) のいずれかに記載の抗酸化剤。

(5) ラクトバチルス・ガセリ (*Lactobacillus gasserii*) に属する乳酸菌を培養して得られる培養物及び／または菌体を添加した抗酸化作用を有する飲食品又は飼料。

## 【0018】

【発明の実施の形態】本発明は、上記した課題を解決するためになされたものであって、本発明者らは、目的とする乳酸菌をスクリーニングするに際し、次のような基準を新たに設定し目的に合致する株を選定した。すなわち、本発明者らは、醗酵乳やヒト由来の数多くのラクトバチルス・ガセリのうち、胃酸耐性が高い、低 pH 条件下での生育が良好である、血清コレステロールの上昇を抑制する、ヒト腸管へ高い定着性を示す、ヒト腸管細胞親和性を示す、胆汁酸耐性がある、生体内酸化を強く抑制する、食品に適用した際に生残性が高く、香味、物性も優れている等々の条件を設定し、菌株の選定につき鋭意研究を重ねた。このような条件を満足するラクトバチルス・ガセリ菌については全く知られていなかった。本条件によってスクリーニングした結果、これらの条件に合致する菌株として以下の菌株を選択することができた。なお、これらの菌株は、下記の寄託番号により独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに寄託されている。

## 【0019】菌株

ラクトバチルス・ガセリ (*Lactobacillus gasserii*) SBT10801 FERM P-18137

ラクトバチルス・ガセリ (*Lactobacillus gasserii*) SBT1703 FERM P-17785

ラクトバチルス・ガセリ (*Lactobacillus gasserii*) SBT10241 FERM P-17786

ラクトバチルス・ガセリ (*Lactobacillus gasserii*) SBT0274 FERM P-17784

ラクトバチルス・ガセリ (*Lactobacillus gasserii*) SBT10239 FERM P-16639

ラクトバチルス・ガセリ (*Lactobacillus gasserii*) SBT2055 FERM P-15535

さらにこれらの菌株は、ヒト腸管細胞に高い親和性を有し、経口で投与した時、生存して腸管内に到達することができ長期間腸管内に常在することが可能である。そし

てラクトバチルス・ガセリに属する乳酸菌が腸内に定着し、生体内酸化を防止する効果を示すことは全く知られておらず、本発明者らによって始めて明らかにされた。さらに本発明では、上記寄託菌に限らずヒトや醗酵乳から分離されるラクトバチルス・ガセリ (*Lactobacillus gasserii*) であって、上記の作用を示すものであれば、いずれのものでも使用できる。

【0020】次にこれらの乳酸菌の培養方法を記す。本発明のラクトバチルス・ガセリ (*Lactobacillus gasserii*) の培養基には、乳培地または乳成分を含む培地、これを含まない半合成培地等種々の培地を用いることができる。このような培地としては、脱脂乳を還元して加熱殺菌した還元脱脂乳培地を例示することができる。培養法は静置培養またはpHを一定にコントロールした中和培養で行うが、菌が良好に生育する条件であれば特に培養法に制限はない。

【0021】本発明は上述のようにして得られる培養物及び／または菌体を有効成分とする。また乾燥した粉末を有効成分としてもよい。これらの乾燥は凍結乾燥で行なうことが菌体を変質させることなく乾燥することができるので好ましい。これらの有効成分は経口摂取することが望ましい。その摂取に際しては、高コレステロール含有食品に添加して同時に摂取するか、それ自体を高コレステロール食品の摂取の前後に摂取してもよい。また、これらの粉末は乳糖等の適当な賦形剤と混合し粉剤、錠剤、丸剤、カプセル剤または粒剤等として経口投与することができる。投与量は、投与対象者の症状、年齢等を考慮してそれぞれ個別に適宜決定されるが、通常成人1日当たり乾燥物として0.5～50gであり、これを \*

\* 1日数回に分けて投与するとよい。本発明においては、ヒト腸管内にラクトバチルス・ガセリが定着することによってより強い効果を発揮する。このため特に好ましくは、生菌として成人一人当たり $10^8 \sim 10^{12}$  cuf/日投与することで本発明の目的とする効果を発揮させることが可能となる。このようにして摂取することによって腸管内に定着し所望の効果を発揮する。

【0022】また、本発明の有効成分は、飲食品の製造工程中に原料に添加してもよい。飲食品としてはどのような飲食品でもよく、その例として、果汁、乳飲料、清涼飲料等の飲料、菓子類、或いは脂質含量の高いバター等の乳製品、マヨネーズ等の卵加工品、バターケーキ等の食品をあげることができる。但し、本発明の特性として乳酸菌が生存した状態で腸管に定着することが必要であり、過度の加熱は避けなければならない。また、マイクロカプセル等の従来技術を採用して、加熱を避ける手段を講じることも必要であろう。さらにまた、本発明における飲食品は、前述したラクトバチルス・ガセリ (*Lactobacillus gasserii*) の菌株を使用して乳酸発酵を行なって製造されたヨーグル等であっても良い。

【0023】以下に本発明に用いる乳酸菌株としてLG2055 (FERM P-15535) を用いた試験例を示し、菌学的性状及びインビトロ、インビボによる効果を具体的に説明する。しかし、本発明はこの記載内容に限定されるものではない。

乳酸菌の性状

【0024】

【表1】

菌学的性状

グラム染色性	+
菌形	単～連鎖状桿菌
コロニー形態	灰白色で光沢のあるコロニー
好気性生育能	+
嫌気性生育能	+
リトマスミルク反応	RC
カタラーゼ反応	—
ガス産生能	—
乳酸発光性	DL
Glycerol	—
Erythritol	—
D-Arabinose	—
L-Arabinose	—
Ribose	—
D-Xylose	—
L-Xylose	—
Adonitol	—
D-Methyl-xylose	—
Galactose	+
D-Glucose	+
D-Fructose	+
D-Mannose	+
L-Sorbose	—
Rhamnose	—
Dulcitol	—
Inositol	—
Mannitol	—
Sorbitol	—
α-Methyl-D-mannose	—
α-Methyl-D-glucose	—
N-Acetyl glucosamine	+
Amygdaline	+
Arbutine	(+)

Esculine	+
Salicin	+
Cellobiose	+
Maltose	+
Lactose	+
Melibiose	—
Saccharose	+
Trehalose	+
Inuline	—
Melezitose	—
D-Raffinose	—
Anidom	+
Glycogane	—
Xylitol	—
D-Gentibiose	+
D-Furanose	—
D-Tylose	—
D-Tagatose	+
D-Fucose	—
L-Fucose	—
D-Arabitol	—
L-Arabitol	—
Glucosate	—
2 keto-glucosate	—
6 keto-glucosate	—

## 【0025】遺伝学的特性

## DNA相同性試験

以下に記載した、ラクトバチルス・アシドフィルスの基準株、被験菌LG2055株、そしてコントロールとして、大腸菌 (*Escherichia coli*) のDNAを抽出、精製した。

被験菌: LG2055株

基準株: ラクトバチルス・アシドフィルスJCM1132株

ラクトバチルス・クリスパタスJCM1185株

ラクトバチルス・ガリナラムJCM2011株

ラクトバチルス・アミロボラスJCM1126株

ラクトバチルス・ガセリJCM1131株

ラクトバチルス・ジョンソニーJCM2012株

大腸菌 (*Escherichia coli*)

LG2055株のDNA同士の相同性を100%、LG2055株と大腸菌とのDNA相同性を0%としたときの、LG2055株と各基準株のDNA相同性をDNAハイブリダイゼーション法により検討した。その結果、LG2055株はラクトバチルス・ガセリJCM1131株と90%以上の相同性を有していたため、LG2055株はラクトバチルス・ガセリと同定された。

## 【0026】胃酸耐性

胃酸耐性試験は瀧口らの方法 (腸内細菌学雑誌 14. 11-18. 2000) に従って pH2.0の人工胃液を調製し胃酸耐性試験を行ったところLG2055株は3時間以上生存した。

## 【0027】人工腸液耐性

瀧口らの方法 (腸内細菌学雑誌 14. 11-18. 2000) に従って胆汁末を含む人工腸液を調製し、これに前記の人工胃液処理を行ったLG2055株を加えて耐性を試験したところ、20時間以上の生存性を示した。LG2055株は、消化管を通過し、大腸まで生存して到達することが確認された。

## 【0028】インビトロでの抗酸化作用

B. Halliwellらのデオキシリボース法 (Analytical Bio\*

\*chemistry, Vol. 165, pp. 215-219 (1987)) によりLG2055株の培養産物を用いて調べたところヒドロキシルラジカル消去効果を示した。また、SOD様活性をSODテストワコー (和光純薬工業社製) を用いて測定したところSOD様活性を示した。

## 【0029】

ヒトの腸管通過能と腸内定着性無脂乳固形9.5%、乳脂肪3.0%の乳にLG2055のスターターを4%接種して39度で4時間醗酵させた醗酵乳を健康な成人ボランティア42名に4週間、毎日100gを1日1回食させて腸内菌の変化を観察した。試験期間中は腸内菌に影響のある食品やオリゴ糖、薬品の摂取を禁ずる以外は自由に食事をさせて評価を行った。試験前は検出されなかったLG2055株がすべての被験者から4週間後には検出され、LG2055株が高い腸内定着性を有することがわかった。

## 【0030】インビボでの生体内抗酸化効果試験

## 1. 乳酸菌脱脂乳培養物の調製

LG2055を用い、115℃、20分間の滅菌処理をした0.5%酵母エキス (アサヒビール社製) 添加11.55%脱脂乳培地にて、37℃、16時間の培養を3代以上行って賦活させた。これを同培地に3%接種し、37℃で16時間培養した。得られた培養物は、凍結乾燥後、乳鉢で粉碎した。

## 【0031】2. 試験飼料

## 食餌組成

表2にAIN-76TM (オリエンタル酵母社製) に準拠した食餌組成を示した。この飼料に10%脱脂粉乳、又は上記脱脂粉乳乳酸菌培養物を添加し、さらに、添加物に含まれるタンパク質量を考慮してガゼインを添加した。

## 【0032】

30 【表2】

成分	食餌組成			
	実験群			
	1	2	3	4
	グラム/キログラム 組成			
ビタミンフリーカゼイン	165.9	165.0	165.9	165.0
サフラワー油 a	100	100	0	0
サフラワー油 (ビタミンE除去) b	0	0	100	100
バターオイル	3.4	0	3.4	0
脱脂乳	100	0	100	0
発酵脱脂乳	0	100	0	100
セルロース	50	50	50	50
ミネラルミックス	35	35	35	35
ビタミンEフリービタミンミックス	10	10	10	10
D,L-メチオニン	3	3	3	3
重過硫酸コリン	2	2	2	2
コーンスターチ	150	150	150	150
シロ	380.7	385.0	380.7	385.0

a α-トコフェロール含有サフラワー油

(49.4mg α-トコフェロール/100グラム油)

b α-トコフェロール除去サフラワー油

(9.4mg α-トコフェロール/100グラム油)

【0033】脱脂粉乳培養物と脱脂粉乳の粗タンパク質 50 含量(%)は35.0と34.1で、アミノ酸組成に差異は認めら

れなかった。抗酸化性成分の効果の評価を容易にするために、齧歯類用飼料中の通常のビタミンEレベルよりも低いビタミンEを含む飼料に調製を行った。この目的のために、ビタミンEフリーのビタミン混合物を用いた。また、油脂源として市販のサフラワー油(9.4mg  $\alpha$ -トコフェロール)を用いた(それぞれの油脂を含む飼料を高ビタミンE及び低ビタミンE飼料とした)。ビタミンEは両乳製品で検出されなかった。なお、脱脂粉乳培養物は脱脂乳と比較してコハク酸、乳酸、ギ酸、酪酸を高濃度含んでいた。脱脂乳とサフラワー油あるいは活性炭処理とサフラワー油を含む飼料群をそれぞれ、1、3群とした。脱脂粉乳培養物とサフラワー油あるいは活性炭処理とサフラワー油を含む飼料群をそれぞれ、2、4群とした。

#### 【0034】実験動物

5週齢のSprague-Dawley系雄ラット(各群12匹)を用いた。表2の飼料で4週間飼育した。この間水を自由に与えた。飼育終了後、エーテル麻酔下で大動脈採血によってと殺した。

#### 【0035】分析

常法に従って、赤血球の溶血反応抑制活性、血清、肝臓と赤血球のthiobarbituric acid reactive substance(TBARS)濃度、血漿と肝臓の $\alpha$ -トコフェロール濃度および肝臓のグルタチオン濃度をそれぞれ測定した。血漿と肝臓のホモジネート(0.25ml)について、FeSO<sub>4</sub>とCumene hydroperoxideを添加し一定時間インキュベーションし、過酸化物の生成を、TBARSを指標にして測定した。

#### 【0036】統計処理

結果は平均値と標準誤差で表し、Duncanの多重比較検定法およびANOVA検定を行った。

#### 【0037】実験結果

表3から明かなように、Sprague-Dawley系ラットの体重増加量、摂食量は食事の影響を受けなかったが、高ビタミンE食-脱脂乳群で肝臓重量がやや低下した。

#### 【0038】

##### 【表3】

脱脂乳と発酵乳によって飼育したラットの生長パラメーター

実験群	体重増加	飼料摂取量	肝体重比
	グラム/4週間	グラム/日	グラム/100グラム体重
1	198±7	19.9±0.5	3.33±0.07a
2	192±5	19.7±0.5	3.63±0.07b
3	201±6	19.4±0.4	3.71±0.08b
4	181±11	18.7±0.7	3.61±0.09b

ab異なる上書き文字は危険率5%での有意差を示す

【0039】赤血球の溶血阻害活性に対する食事の影響を図1に示した。低ビタミンE-脱脂乳群(3)で、僅かではあるが赤血球の溶血阻害活性が低下した。一方、低ビタミンE-発酵脱脂乳群では溶血阻害活性の低下は見られなかった。

【0040】赤血球のTBARS濃度は、低ビタミンE食ラ

ット(3,4)で高ビタミンE食ラット(1,2)よりも低下した(図2)。赤血球の場合と類似して、Cumene hydroperoxideで処理していない血漿のTBARS濃度も低ビタミンE食ラット(3,4)で低下した(図3)。この場合のTBARS濃度は、発酵脱脂乳群(2,4)で対応する脱脂乳群(1,3)と比較して低い傾向にあり、特に、高ビタミンE-発酵脱脂乳群のTBARS濃度は相当する脱脂乳群と比較して有意に低下した(図3)。ヒドロペルオキシド処理によって血漿TBARS濃度はいずれも増加したが、その増加は低ビタミンE食ラット(3,4)で顕著であり、発酵脱脂乳群(4)でその上昇は脱脂乳添加群(3)よりも抑制された。

【0041】図4に肝臓のTBARS濃度を示した。赤血球や血漿の場合と異なり、ヒドロペルオキシド処理を行っていない肝臓ホモジネートのTBARS濃度は低ビタミンE食ラット(3,4)で、高ビタミンE食ラット(1,2)よりも低かった。ヒドロペルオキシド処理によって肝臓ホモジネートのTBARS濃度増加し、特に、低ビタミンE食ラット(3,4)で顕著であった。この場合、発酵脱脂乳添加の影響は見られなかった。

【0042】図5に肝臓のグルタチオン濃度を示した。還元型グルタチオン濃度は高ビタミンE食ラット(1,2)と比較して低ビタミンE食ラット(3,4)で高かった。還元型グルタチオン濃度に対する発酵脱脂乳添加の影響は見られなかった。酸化型グルタチオン濃度は高ビタミンE-脱脂乳群(1)で相当する発酵脱脂乳群(2)や他群(3,4)よりも高値を示した。

【0043】血漿、赤血球、肝臓の $\alpha$ -トコフェロール濃度を図6に示した。これらの $\alpha$ -トコフェロール濃度は、予想されるように、低ビタミンE食ラット(3,4)で高ビタミンE食ラット(1,2)と比較して顕著に低かった。血漿の $\alpha$ -トコフェロール濃度は、発酵脱脂乳群(2,4)で対応する脱脂乳群(1,3)よりも高い傾向にあり、特に、低ビタミンEラット飼料-発酵脱脂乳群(4)で相当する脱脂乳群(3)と比較して有意に高かった。赤血球 $\alpha$ -トコフェロール濃度には発酵脱脂乳添加の影響は見られなかった。肝臓では、高ビタミンE-発酵脱脂乳群(2)で相当する脱脂乳群(1)よりも $\alpha$ -トコフェロール濃度は、高かった。

【0044】表4に血漿と肝臓の脂質濃度を示した。低ビタミンE食ラット(3,4)で高ビタミンE食ラット(1,2)と比較して血清トリグリセリド濃度は高く、また、発酵脱脂乳群(2,4)で脱脂乳群(1,3)よりも高い傾向にあった。血漿のコレステロールとリン脂質、肝臓のトリグリセリド濃度には食事の影響は見られなかった。肝臓のコレステロールとリン脂質濃度は低ビタミンE食ラット(3,4)で高ビタミンE食ラット(1,2)と比較して低下した。

#### 【0045】

##### 【表4】

油 脂	実験群			
	1	2	3	4
血しょう (ミリグラム/デシリットル)				
トリグリセリド	56.8±6.5a	71.7±9.3ab	83.0±9.0ab	99.5±11b
コレステロール	72.0±3.9a	80.2±4.7a	81.4±4.6a	78.8±6.4a
リン脂質	115±5.8a	127±8.6a	139±7.4a	137±12a
肝臓 (ミリグラム/グラム)				
トリグリセリド	14.8±3.1a	18.7±5.2a	13.6±2.0a	14.0±1.2a
コレステロール	3.46±0.14a	3.33±0.09a	2.88±0.18b	2.82±0.10b
リン脂質	35.0±0.58a	34.5±0.29a	31.3±0.41b	32.1±0.43b

ab異なる上書き文字は危険率5%での有意差を示す

【0046】以上の結果以下のことが判明した。本実験では、ラット食餌のビタミンEレベルを調整することによって生体内の酸化ストレスが異なる条件を設定した。そのために、食事のビタミン混合からビタミンEを除いた。また、市販の植物油にはビタミンEが含まれていることから、飼料に用いる植物油を活性炭処理することでビタミンEを除いた。そして、飼料中のビタミンEのレベルが、AIN-76食のビタミン混合を用いて調製された標準食から供給される量の約98.8%(高ビタミンE食)と18.8%(低ビタミンE食)の2段階となるように設定した。その結果、低ビタミンE食を与えた場合には、血漿のCumene hydroperoxideによる過酸化反応の亢進に対して、本発明の発酵乳は抗酸化作用を示した。また、赤血球の溶血阻害活性に対しても、本発明の発酵乳は有効であった。低ビタミンE食ラットにおける血漿ビタミンEレベルの低下は脱脂乳群で本発明の発酵脱脂乳群よりも高かった。

【0047】したがって、本発明の発酵脱脂乳はビタミンE消耗の抑制を介して、生体内の酸化ストレス上昇に伴う過酸化物質の上昇や溶血阻害活性の低下に対して作用したものと判断できる。以上のインビボ実験の結果本発明が生体内抗酸化効果を有していることが確認された。

【0048】以下に実施例を示して本発明を具体的に説明する。しかし、本発明はこの実施例に限定されるものではない。

#### 【実施例】実施例1

LG2055株を10%還元脱脂乳培地(121℃、10分加熱)で培養し、本培養物を凍結乾燥し粉末化し、抗酸化剤を調製した(A)。

#### 【0049】実施例2

LG2055株をヨーグルトミックス(生乳に2%脱脂乳を添加し、100℃、10分加熱した)に接種し、20℃で24時間培養した。紙カップに充填し冷却後、抗酸化ヨーグルトとした(B)。

#### 【0050】実施例3

LG2055株をホエー培地(0.5%酵母エキス、0.1%トリブチケースペプトン添加)で培養後遠心分離で菌体を回収

した。この菌体1gを乳糖5gと混合し顆粒状に成形して顆粒剤を得た。

#### 【0051】実施例4

高コレステロール含有食品に配合した例を示す。

発酵バター	(wt/wt)
乳脂肪	96.8%
食塩	1.2
実施例1で得られた抗酸化剤(A)	2

#### 【0052】バターケーキ

wt)	(wt/
バター	24%
薄力粉	24
砂糖	24
全卵	24
実施例2で得られた抗酸化剤(B)	4
香料	少々

#### 【0053】マヨネーズ

wt)	(wt/
サラダ油	65.4%
卵黄	17
食酢	10
実施例1で得られた抗酸化剤(A)	3
香辛料	4.4
グルタミン酸モノナトリウム	0.6

#### 【0054】実施例5

LG2055株をMRS液体培地(Difco社製)5Lに接種後、37℃、18時間静置培養を行った。培養終了後、7,000rpm、15分間遠心分離を行い、培養液の1/50量の濃縮菌体を得た。次いで、この濃縮菌体を脱脂粉乳10%(重量)、グルタミン酸ソーダ1%(重量)を含む分散媒と同量混合し、pH7に調整後、凍結乾燥を行った。得られた凍結乾燥物を60メッシュのフルイで粉体化し、凍結乾燥菌末を得た。

#### 【0055】実施例6

第13改正日本薬局方解説書製剤総則「散剤」の規定に準拠し、上記実施例で得られたLG2055株の凍結乾燥菌末1gにラクトース(日局)400g、バレイショデンプン(日局)600gを加えて均一に混合し、散剤を製造した。

#### 【0056】実施例7

脱脂乳を80~85℃で20~30分間殺菌した後、ホモゲナイズし、冷却した。これにスターターとして本菌株LG2055株の純培養物を2~5%加え、37~40℃で16時間発酵させ、乳酸含量2%の酸乳(脱脂乳培地における培養物)を得た。ついで、生じたカードを砕きながら、5℃に冷却し、これを酸乳とした。別に、しよ糖15%のほかに適量の酸味料、香料、色素を含有する糖液を調合し、ホモゲナイズし、70~80℃で20~30分間殺菌した後、5℃に冷却し、糖液とした。このようにして得た酸乳35に対して糖液65の割合で混合して酸乳飲料を得た。

## 【0057】実施例 8

ビタミンC 40 g またはビタミンC とクエン酸の等量混合物 40 g、グラニュー糖 100 g、コーンスターチと乳糖の等量混合物 60 g に、上記実施例 1 で得た本菌株の脱脂乳培地における培養物の凍結乾燥物を 40 g 加えて十分に混合した。混合物を袋に詰め、1 袋 1.5 g のスティック状栄養健康食品を 150 袋製造した。

## 【0058】実施例 9

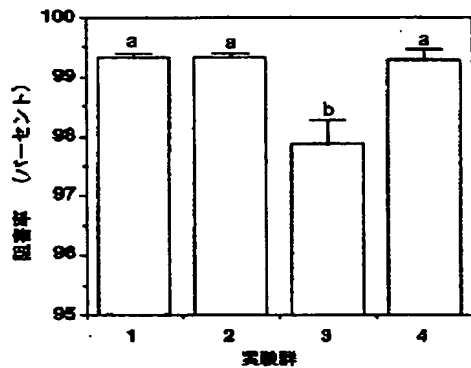
次の配合により生体内抗酸化剤を製造した。

- (1) LG2055 株の脱脂粉乳培地における培養物の凍結乾燥物 50 g、  
 (2) ラクトース 90 g、  
 (3) コーンスターチ 29 g、  
 (4) ステアリン酸マグネシウム 1 g、この混合物を圧縮錠剤機により圧縮して、1 錠あたり有効成分を 40 mg 含有する錠剤 100 個を製造した。

## 【0059】

【発明の効果】本発明によれば、ラクトバチルス・ガセ

【図 1】



- 実験群 1. 脱脂乳 (10%) + サフラワー油給餌  
 2. 脱脂乳 (10%) + 活性炭処理サフラワー油 給餌  
 3. 脱脂乳 培養物 (10%) + サフラワー油給餌  
 4. 脱脂乳培養物 (10%) + 活性炭処理サフラワー油給餌

ab 異なる上書き文字は危険率 5 % での有意差を示す

リ (*Lactobacillus gasseri*) に属する乳酸菌を培養して得られる菌体、その培養物を有効成分とする抗酸化剤に乳酸菌及び／またはその変異株を主成分とする抗酸化剤が提供することができる。本発明の抗酸化剤は、毒性及び副作用が極めて少なく、また、食品素材としても有用である。

【図面の簡単な説明】

【図 1】飼育ラットの赤血球溶血阻害活性を示す。

【図 2】飼育ラットの赤血球チオバルビツール酸反応物質質量を示す。

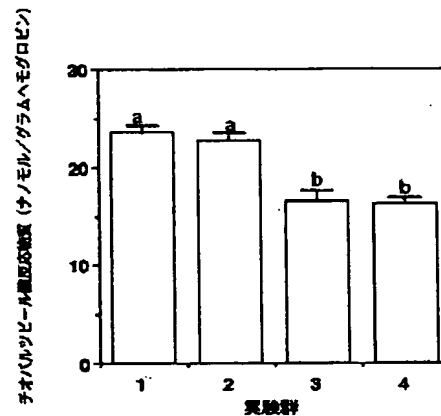
【図 3】血漿中のチオバルビツール酸反応物質質量を示す。

【図 4】肝臓中のチオバルビツール酸反応物質質量を示す。

【図 5】肝臓中のグルタチオン濃度を示す。

【図 6】血漿中、赤血球、肝臓のビタミン E 濃度を示す。

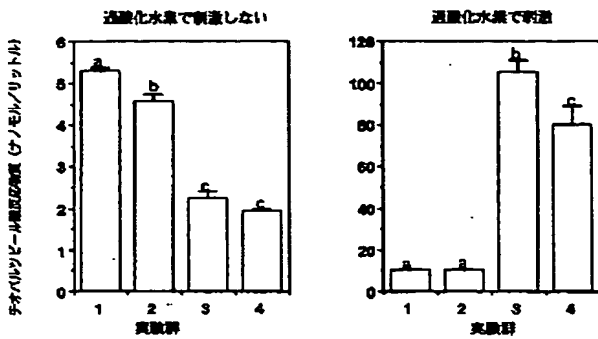
【図 2】



- 実験群 1. 脱脂乳 (10%) + サフラワー油給餌  
 2. 脱脂乳 (10%) + 活性炭処理サフラワー油 給餌  
 3. 脱脂乳 培養物 (10%) + サフラワー油給餌  
 4. 脱脂乳培養物 (10%) + 活性炭処理サフラワー油給餌

ab 異なる上書き文字は危険率 5 % での有意差を示す

【図3】

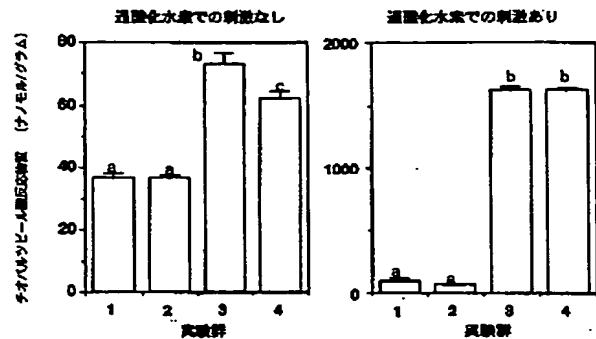


血しょうは滅菌化水素クメンの存在ないし非存在下にインキュベートし、デオキシリボース反応生成物をそれぞれ独立に測定した。

- 実験群 1. 脱脂乳(10%) + サフラワー油給餌  
2. 脱脂乳(10%) + 活性炭処理サフラワー油 給餌  
3. 脱脂乳 培養物(10%) + サフラワー油給餌  
4. 脱脂乳培養物 (10%) + 活性炭処理サフラワー油給餌

abc 異なる上書き文字は危険率5%での有意差を示す

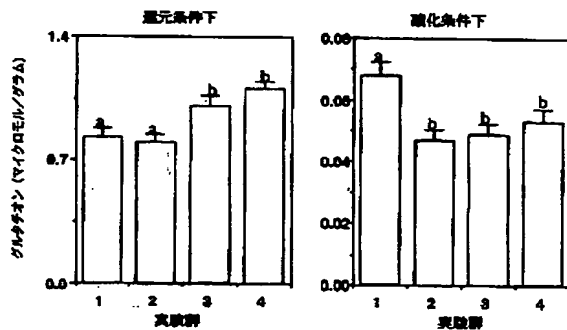
【図4】



- 実験群 1. 脱脂乳(10%) + サフラワー油給餌  
2. 脱脂乳(10%) + 活性炭処理サフラワー油 給餌  
3. 脱脂乳 培養物(10%) + サフラワー油給餌  
4. 脱脂乳培養物 (10%) + 活性炭処理サフラワー油給餌

abc 異なる上書き文字は危険率5%での有意差を示す

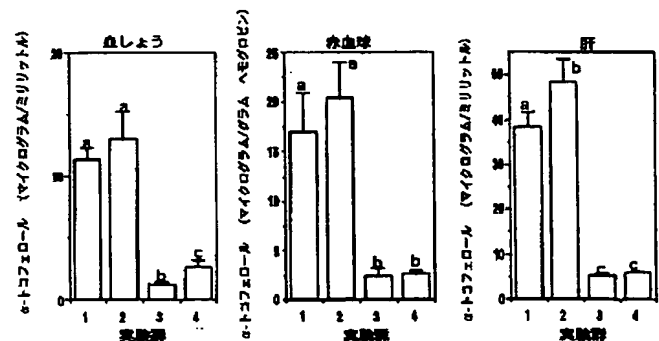
【図5】



- 実験群 1. 脱脂乳(10%) + サフラワー油給餌  
2. 脱脂乳(10%) + 活性炭処理サフラワー油 給餌  
3. 脱脂乳 培養物(10%) + サフラワー油給餌  
4. 脱脂乳培養物 (10%) + 活性炭処理サフラワー油給餌

abc 異なる上書き文字は危険率5%での有意差を示す

【図6】



- 実験群 1. 脱脂乳(10%) + サフラワー油給餌  
2. 脱脂乳(10%) + 活性炭処理サフラワー油 給餌  
3. 脱脂乳 培養物(10%) + サフラワー油給餌  
4. 脱脂乳培養物 (10%) + 活性炭処理サフラワー油給餌

abc 異なる上書き文字は危険率5%での有意差を示す

フロントページの続き

(51) Int. Cl. 7

A 6 1 K 35/20

35/74

A 6 1 P 39/06

識別記号

F I

A 6 1 K 35/74

A 6 1 P 39/06

A 2 3 L 2/00

テーマコード(参考)

A 4 H 0 2 5

F

F ターム(参考) 2B150 AC05 AC06 DD12 DD26  
4B001 AC31 BC14 EC05  
4B017 LC03 LK18 LK21  
4B018 LB07 MD86 ME06 MF13  
4C087 AA01 AA02 AA03 BB39 BC56  
CA09 CA10 MA35 MA36 MA37  
MA41 MA43 MA52 NA14 ZC37  
4H025 BA00